

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 16 February 2000 (16.02.00)	
International application No. PCT/EP99/04310	Applicant's or agent's file reference 17316P WO
International filing date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)	Priority date (day/month/year) 22 June 1998 (22.06.98)
Applicant KARL, Johann et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

05 January 2000 (05.01.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. E. Stoffel Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543, 33/58, 33/569, 33/576, 33/545	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/67643 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Dezember 1999 (29.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04310 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juni 1999 (22.06.99) (30) Prioritätsdaten: 198 27 714.8 22. Juni 1998 (22.06.98) DE 198 38 802.0 26. August 1998 (26.08.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARL, Johann [DE/DE]; Bert-Schratzleer-Strasse 7, D-82380 Peissenberg (DE). HORN AUER, Hans [DE/DE]; Schongauer Strasse 102 e, D-82380 Peissenberg (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: <u>IMPROVED BINDING ASSAYS THROUGH MULTIEPITOPE ANALYSIS AND COMBINED ANTIGEN AND ANTIBODY DETERMINATION</u> (54) Bezeichnung: VERBESSERUNG VON BINDEASSAYS DURCH MULTIEPITOPANALYSE UND KOMBINATION VON ANTI-GEN- UND ANTIKÖRPER-BESTIMMUNG (57) Abstract <p>The invention relates to a method for detecting an analyte in a sample, comprising the following steps: (a) preparation of a solid phase consisting of a non-porous support and at least two physically separated test surfaces, whereby each test surface contains different immobilized analyte-specific receptors; (b) the sample is brought into contact with the solid phase and a second analyte-specific receptor that carries a signal emitting group or that can be bonded to a signal emitting group; and (c) the presence and/or amount of the analyte is detected by determining the signal emitting group on the solid phase.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es wird ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe beschrieben, umfassend die Schritte: (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten; (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem zweiten analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verbesserung von Bindeassays durch Multiepitopenalyse
und Kombination von Antigen- und Antikörper-Bestimmung**

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe, wobei der Nachweis des Analyten mit unterschiedlichen, an den Analyten bindefähigen Reagenzien geführt wird.

10 Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Festphase zum Nachweis eines Analyten, wobei die Festphase einen nichtporösen Träger und räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei jede Testfläche unterschiedliche Reagenzien enthält. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses
15 Antigen gerichteten Antikörpers sowie eine Festphase zur Durchführung dieses Verfahrens.

Eine Vielzahl von Analyten kann durch immunologische Nachweisverfahren bestimmt werden. Solche immunologische Nachweisverfahren nutzen die
20 spezifische Bindefähigkeit von Analyten mit bestimmten Reagenzien, wie beispielsweise Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Grundsätzlich können immunologische Bestimmungen in einer Reihe von Testformaten durchgeführt werden, wie etwa dem Sandwichtestformat, dem indirekten Testformat, dem Rücktitrationsformat oder dem Brückenformat.

25

Ein zuverlässiger Nachweis von Infektionserkrankungen, z.B. einer Infizierung mit Viren wie etwa HIV, HBV oder HCV, ist von besonderem Interesse, um die Erkrankung bei betroffenen Personen möglichst frühzeitig diagnostizieren zu können. Im Allgemeinen werden immunologische
30 Bestimmungen von Antikörpern gegen HIV, HBV oder HCV im indirekten Testformat oder mittels Brückenformat durchgeführt. Zum Nachweis der Antikörper werden dabei zumeist Gemische verschiedener Proteine bzw.

Peptide verwendet, die Epitope aus der Core- und Envelope-Region des Erregers umfassen. Dieses Gemisch wird auf einem Träger, d.h. einer Festphase, immobilisiert. Da die Einstufung als HIV-positiv für den Einzelnen von großer Bedeutung ist und falsch positive Ergebnisse fatale Folgen haben können, ist es derzeit notwendig, alle bei dieser immunologischen Bestimmung in Routinetests erhaltenen positiven Ergebnisse in einem Bestätigungstest zu überprüfen. Als Bestätigungstest wird üblicherweise ein Westernblot verwendet, bei dem die einzelnen Proteinbestandteile eines Viruslysats auf einen porösen Träger aufgeblottet sind. Im Fall von HCV ist es allerdings sehr schwierig, den Virus zu züchten. Deshalb wird hier als Bestätigungstest kein Westernblot mit Viruslysat sondern ein RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) durchgeführt, bei dem es sich um einen Immunodotblot, der rekombinante Proteine bzw. Peptide als Testreagenzien umfaßt, handelt.

Ein großer Nachteil der derzeit verwendeten Routinetests besteht darin, daß je nach Analyt Gemische von 5 bis 10 oder mehr Antigenen zum Nachweis eingesetzt werden. Zwar werden die Routinetests laufend verbessert, ein vollständiger Verzicht auf Bestätigungstests konnte jedoch noch nicht erreicht werden. Beispielsweise wird im Enzymun® HIV-Test (Boehringer Mannheim) ein Gemisch aus ca. 5 verschiedenen Antigenen verwendet, welche für den Nachweis sowohl biotinyliert als auch Digoxigenin-markiert sind. Obwohl der Test gut funktioniert, bedeutet die Verwendung von Antigengemischen mit einer derart hohen Anzahl verschiedener Antigene, daß die einzelnen auf der Festphase immobilisierten bzw. gebundenen Antigene nicht mehr in einer für den Nachweis optimalen Konzentration vorliegen können. Die Bindekapazität der Festphase ist bei einem solchen Gemisch aus einer Vielzahl von Komponenten nicht mehr ausreichend, um alle Antigene in der optimalen Konzentration zu binden. Weiterhin hat die Verwendung eines Antigen-Gemisches bei der Beschichtung einer Testfläche zur Folge, daß die verschiedenen Antigene um die Bindungsstellen auf der Festphase kompetieren und die unterschiedlichen

Größenverhältnisse zu unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten und zu unterschiedlichen sterischen Effekten führen. Bei einer Direktbeschichtung werden z.B. hydrophobe Antigene bevorzugt an die Kunststoffoberfläche gebunden, während gleichzeitig hydrophilere Antigene verdrängt werden. Dies führt dazu, daß zum einen nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden und zum anderen die Konzentration bestimmter Antigen-Epitope so gering wird, daß ein signifikanter Nachweis nicht mehr möglich ist.

Ein weiterer Nachteil der Verwendung von Antigengemischen in Routinetests liegt darin, daß durch das Gemisch unterschiedlicher Antigene die Gefahr einer erhöhten unspezifischen Bindung deutlich gesteigert wird, was wiederum zu einem Anstieg falsch positiver Ergebnisse führt. Dies bewirkt, daß bei den bisher verwendeten Routinetests die Cut-off-Grenze relativ hoch gesetzt werden muß und somit Sensitivität verloren geht. Vor allem im Westernblot nimmt aufgrund von im Viruslysate vorliegenden Fremdproteinen die Zahl der falschpositiven Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindung deutlich zu, so daß mindestens 2 reaktive Banden für ein positives Ergebnis gefordert werden.

Es wurde versucht, die Sensitivität dieser Nachweisverfahren weiter zu verbessern. EP 0 461 462 A1 beschreibt einen Immunoassay zum Nachweis von viralen Antikörpern mit Hilfe eines indirekten Testkonzepts. Bei dem in EP 0 461 462 A1 beschriebenen Immunodotblot werden anstelle eines üblichen Viruslysats aufgereinigte rekombinante Proteine einzeln in diskreten Testflächen auf einen porösen Träger aufgetragen, wobei ein Testformat erhalten wird, das aufgrund der Verwendung aufgereinigter Proteine sensitiver als ein Westernblot ist.

EP 0 627 625 A1 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von viralen Antikörpern in einer Probe mittels Brückenkonzept. Auch bei diesem Verfahren handelt es sich um einen RIBA (Recombinant Immunoblot Assay),

bei dem mehrere Antigene räumlich getrennt auf eine Festphase aus einem porösen Material aufgebracht werden, wobei auf die Notwendigkeit der Verwendung einer Festphase aus porösem Material hingewiesen wird.

- 5 EP 0 445 423 A2 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von HCV-Antikörpern mit Hilfe mehrerer Epitope eines HCV-Antigens. Auch in EP 0 445 423 A2 wird ein Immunodotassay zur Antikörperbestimmung beschrieben, wobei eine höhere Sensitivität durch die Verwendung bestimmter, verbesserter Antigene erzielt wird.

10

Bei diesen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren ist jedoch aufgrund der Verwendung eines porösen Trägers das definierte Aufbringen einer vorbestimmten Reagenzmenge schwierig. Insbesondere besteht die Gefahr des Ineinanderlaufens der einzelnen aufgetragenen Testspots. Diese Nachteile werden um so gravierender, je kleiner die aufgetragenen Spots werden, so daß diese Verfahren insbesondere für miniaturisierte Testsysteme nicht geeignet sind. Außerdem ist die Handhabung von Papierstreifen schwer automatisierbar und somit als Routinetest nicht denkbar.

20

Eine Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, durch das die im Stand der Technik auftretenden Nachteile zumindest teilweise beseitigt werden können.

- 25 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,

30

- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen.

Der immobilisierte analytspezifische Rezeptor kann sowohl direkt als auch indirekt über einen oder mehrere Rezeptoren an die Festphase gebunden sein. Die Bindung kann beispielsweise durch adsorptive oder kovalente Wechselwirkungen, bevorzugt jedoch durch spezifische hochaffine Wechselwirkungen, z.B. Streptavidin oder Avidin/Biotin oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen erfolgen.

Der freie analytspezifische Rezeptor kann selbst eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sein. In diesem Fall besteht das Nachweisreagenz aus mehreren Komponenten.

Bei dem Analyten kann es sich um eine homogene oder um eine heterogene Population, z.B. eine heterogene Antikörperpopulation, ein Antigengemisch oder ein Gemisch von gegebenenfalls unterschiedlichen Antigenen und Antikörpern handeln, wobei die Antigene und Antikörper von einem oder mehreren Erregern stammen bzw. induziert werden. Die einzelnen Testflächen binden im Fall von heterogenen Analytpopulationen eine Teilpopulation des zu bestimmenden Analyten. Die jeweils auf einer Testfläche immobilisierten analytspezifischen Rezeptoren sind unterschiedlich, d.h. sie binden erfindungsgemäß vorzugsweise an verschiedene Epitope eines homogenen Analyten wie etwa eines Antigens, an verschiedene Analytsubtypen wie etwa Antigensubtypen oder/und an verschiedene Analyttypen wie etwa unterschiedliche Antigene oder/und Antikörper.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Sensitivität von Nachweistests, wie etwa Antikörpertests, durch die Verwendung von Paneltests, bei denen die verschiedenen Reagenzien, z.B. verschiedene Antigene, als Einzelspots, d.h. einzeln auf separaten Testflächen, aufgetragen werden, deutlich verbessert werden kann. Durch die

5 erfindungsgemäße Multiepitopenanalyse, d.h. den gleichzeitigen separaten Nachweis mehrerer Teilpopulationen eines Analyten oder Erregers, wie etwa HIV, kann die Sensitivität und Zuverlässigkeit von Nachweistests erheblich gesteigert werden.

10

Wenn auf einer oder mehreren, in manchen Fällen auf mindestens zwei, Testflächen ein positives Testergebnis erhalten wird, wird dies als Vorhandensein des Analyten in der Probe gewertet.

15

Durch die erfindungsgemäße Verwendung eines nichtporösen Trägers, ist es möglich, die Reagenzien in definierten Flächen aufzubringen. Dies ist insbesondere bei miniaturisierten Testformaten von Bedeutung. Entsprechend weisen die Testflächen bevorzugt einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm, mehr bevorzugt von 0,1 bis 0,5 mm und am meisten bevorzugt

20 von 0,1 bis 0,2 mm auf.

25

Bevorzugt werden Festphasen mit mehreren Testflächen verwendet, die auch als Array-Systeme bezeichnet werden. Solche Array-Systeme sind z.B. bei Ekins und Chu (Clin. Chem. 37 (1995) 1955-1967) und in den US-Patenten 5,432,099, 5,516,635 und 5,126,276 beschrieben.

30

Die erfindungsgemäß verwendete Festphase umfaßt einen für Nachweisverfahren verwendbaren, nichtporösen Träger. Der nichtporöse Träger kann dabei aus einem beliebigen, nichtporösen Material bestehen. Bevorzugt umfaßt der Träger eine Kunststoff-, Glas-, Metall- oder Metalloxydoberfläche. Besonders bevorzugt weist der Träger eine Polystyroloberfläche auf. Auf diesem Träger sind räumlich diskrete Bereiche (Testflächen) angeordnet. Auf

diesen Testflächen sind Reagenzien, wie etwa immobilisierte Festphasenrezeptoren aufgebracht. Die Immobilisierung der Reagenzien auf den Testflächen erfolgt nach bekannten Methoden, z.B. durch direkte adsorptive Bindung, durch kovalente Kopplung oder durch Kopplung über hochaffine Bindungspartee, z.B. Streptavidin/Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin.

Besonders vorteilhaft ist, wenn die räumlich getrennten Testflächen separat mit verschiedenen Reagenzien beladen werden. Durch die Einzelauftragung der verschiedenen Testflächen können für jedes Reagenz, beispielsweise für jedes einzelne Antigen, die optimale Festphasenkonzentration und die optimalen Beschichtungsbedingungen z.B. in Form von speziellen Pufferrezepturen gewählt werden. Dadurch ist es möglich, jeden einzelnen analytspezifischen Rezeptor, z.B. jedes einzelne Antigen bis zur maximalen Bindekapazität der Fläche zu beschichten, während bei den bisher bekannten Tests jeder Rezeptor, z. B. jedes Antigen nur zu einem Teil der verfügbaren Bindekapazität gebunden werden konnte. Durch die separate Auftragung der verschiedenen Reagenzien findet außerdem keine Kompetition der einzelnen Reagenzien, beispielsweise der Antigene, um die Bindungsplätze auf der Festphase statt. Entsprechend ist es bevorzugt, jeweils nur ein Reagenz, das spezifisch mit dem zu bestimmenden Analyten bindefähig ist, pro Testfläche zu binden, so daß jede Testfläche nur einen einzigen Typ eines immobilisierten analytspezifischen Rezeptors enthält. Dieses Reagenz kann gegebenenfalls durch inerte Verdünnermoleküle verdünnt werden, um eine optimale homogene Bindephase zu bilden. Inerte Verdünnermoleküle sind Moleküle, die an die Festphase binden aber keine Wechselwirkung mit dem Analyten oder anderen Probebestandteilen eingehen. Geeignete Verdünnermoleküle sind beispielsweise in WO 92/10757 und in EP 0 664 452 A2 beschrieben.

Bei Testflächen, auf denen nur ein einziges, mit dem Analyten bindefähiges Reagenz, wie etwa ein Antigen, gebunden ist, wurde festgestellt, daß die unspezifische Bindung deutlich reduziert ist. So ist z.B. bei Auftragung

verschiedener Antigene als Einzelspots keine meßbare unspezifische Bindung zu beobachten, während ein Testspot, auf den ein Gemisch aus mehreren Antigenen aufgebracht wurde, eine deutlich meßbare unspezifische Bindung zeigt.

5

Der Nachweis des Analyten erfolgt im erfindungsgemäßen Verfahren auf bekannte Weise durch Verwendung geeigneter Markierungsgruppen, z.B. Fluoreszenzmarkierungsgruppen, chemilumineszierender Gruppen, radioaktiven Markierungen, Enzymmarkierungen, farbigen Markierungen und
10 Solpartikeln. Alternativ kann, bei geeigneten Festphasen, die Wechselwirkung von Bestandteilen des Nachweismediums mit den Testflächen auch durch Bestimmung der Schichtdicke der jeweiligen Flächen z.B. durch Plasmonenresonanzspektroskopie, nachgewiesen werden.

15 Die begrenzten Testflächen können darüber hinaus zur Unterscheidung gegenüber inerten Bereichen der Festphase eine nachweisbare und analytunspezifische Markierungsgruppe enthalten, die neben der analytspezifischen Beschichtungsgruppe nachweisbar ist und mit ihr nicht interferiert. Ein Beispiel für eine solche analytunspezifische
20 Markierungsgruppe ist eine Fluoreszenz-Markierungsgruppe, die bei einer Wellenlänge fluoresziert, die von der Fluoreszenzwellenlänge einer analytspezifischen Markierungsgruppe verschieden ist. Die analytunspezifische Markierungsgruppe wird vorzugsweise, ebenso wie der Festphasenrezeptor, über ein hochaffines Bindepaar, z.B. Streptavidin/Biotin
25 immobilisiert.

Eine weitere Sensitivitätssteigerung kann durch die Verwendung eines universellen Nachweisreagenz erreicht werden. Zuvor kann für jedes Analytmolekül ein separates Nachweisreagenz, welches an das
30 Analytmolekül bindet und eine Markierung, wie etwa ein Enzym, einen Fluoreszenzmarker oder fluoreszierende Latexpartikel trägt, eingesetzt werden. Durch die Kombination mehrerer markierter Nachweisreagenzien

wird jedoch oftmals die Konzentration an Markierungen sehr hoch, so daß die unspezifische Bindung naturgemäß stark zunimmt. Dieses Problem kann durch die Verwendung eines universellen Nachweisreagenz gelöst werden. Erfindungsgemäß bevorzugt werden fluoreszenzmarkierte Latexpartikel als
5 universelles Nachweisreagenz verwendet. Dabei wird für die spezifische Bindung des Analytmoleküls ein analytspezifischer erster Rezeptor verwendet, der selbst keine signalgebende Gruppe trägt. An diesen analytspezifischen ersten Rezeptor bindet ein universeller zweiter markierter Rezeptor, d.h. ein Rezeptor, der analytunabhängig an mehrere,
10 vorzugsweise an alle verwendeten ersten Rezeptoren bindet. Die Kopplung des zweiten Rezeptors an die Markierungsgruppe kann adsorptiv, kovalent über funktionelle Gruppen erfolgen oder über hochaffine Bindepaare, z.B. Streptavidin/Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin erfolgen. Bevorzugt wird das bekannte Dig/Anti-Dig-System verwendet.

15 Ein weiterer Nachteil der Brückentests, die z.B. als 1-Schritt-Reaktion ausgeführt werden, ist, daß der Festphasenrezeptor (z.B. biotinyliertes HIV-gp41) und der freie Nachweisrezeptor (z.B. digoxigenyliertes HIV-gp41) im Verhältnis 1:1 angeboten werden müssen, um ein optimales Signal zu
20 erzielen. Dies ist nachteilig, da aufgrund der beschränkten Bindekapazität der Festphase die Konzentration der einzelnen Festphasenrezeptoren oftmals suboptimal ist und somit auch für den Nachweisrezeptor nicht günstig liegen kann.

25 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können die Festphasenrezeptoren bereits auf der Festphase in optimaler Konzentration gebunden werden. Weiterhin kann auch der Nachweisrezeptor in optimaler Konzentration angeboten werden, da Rezeptorkonjugate mit Digoxigenin oder Biotin im Gegensatz zu Enzym-markierten Rezeptoren nur unwesentlich zu
30 unspezifischer Bindung neigen. Man kann diese Reagenzien im Überschuß einsetzen, so daß Impräzisionen bei der Zugabe des Rezeptors nicht auf die Testpräzision durchschlagen.

Durch spezifische Bindung des zu bestimmenden Analyten an das auf die Testfläche immobilisierte Reagenz, z.B. einen Festphasenrezeptor, kann das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in einer Probe bestimmt werden. Durch kombinierte Auswertung der verschiedenen Testflächen, die
5 jeweils unterschiedliche, spezifisch mit dem Analyten bindefähige Reagenzien enthalten, kann die Sensitivität des Nachweisverfahrens, insbesondere durch eine Verringerung falsch positiver Ergebnisse und die zweifelsfreie Erkennung richtig positiver Ergebnisse, merklich verbessert werden. Von besonderem Interesse ist das erfindungsgemäße Verfahren zur
10 Erfassung bzw. Eliminierung von unspezifischen Bindungen bei qualitativen Tests mit hohen Anforderungen an die Spezifität, wie etwa bei Tests auf Infektionen (z.B. HIV).

Durch die erfindungsgemäße Verwendung von Arrays, d.h. Festphasen, die
15 mindestens zwei, mehr bevorzugt mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens fünf, und bis zu eintausend, mehr bevorzugt bis zu einhundert räumlich getrennte Testflächen umfassen, ist es möglich, mindestens eine dieser Testflächen so auszugestalten, daß sie eine Kontrollfläche darstellt. Folglich umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt die Ver-
20 wendung einer Festphase, die zusätzlich mindestens eine, mehr bevorzugt zwei und am meisten bevorzugt mindestens fünf Kontrollflächen umfaßt. Durch die Integration von Kontrollspots in die Festphase ist es möglich, falsche Resultate aufgrund von Störungen leicht und schnell zu erkennen. Neben den spezifischen Testflächen, ist es weiterhin möglich, einen
25 probenspezifischen Untergrund zu messen und damit einen probenspezifischen Cut-off zu definieren. Die Verwendung eines Testarrays und die Verwendung von Kontrollspots ermöglicht es, die Cut-off-Grenze abzusenken. Der Cut-Off-Wert ist ein Grenzwert, der bei Testverfahren eingesetzt wird, um zwischen positiven und negativen Werten
30 unterscheiden zu können. Ein solcher Cut-Off-Wert ist insbesondere bei Testverfahren, welche Infektionskrankheiten betreffen, von Bedeutung. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich eine Positiv-

/Negativ-Unterscheidung mit erheblich geringerer Fehlerwahrscheinlichkeit zu treffen.

Bei Verwendung von mehreren Testflächen, die jeweils zur Bestimmung
5 unterschiedlicher Analytmoleküle vorgesehen sind, hat sich oftmals eine
testflächenspezifische Definition des Cut-Off-Werts als geeignet erwiesen,
um eine erhöhte Testspezifität (d.h. korrekte Unterscheidung zwischen
positiven und negativen Werten) bei gleichbleibender Sensitivität zu
erhalten.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für beliebigen Nachweismethoden
eingesetzt werden, z.B. für Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungs-
assays, Zucker-Lectin-Assays und ähnliche Verfahren. Das
erfindungsgemäße Verfahren eignet sich auch grundsätzlich zum Nachweis
15 beliebiger Analyten in einer Probe. Besonders bevorzugt erfolgt der
Nachweis des Analyten über spezifische Wechselwirkungen mit einem oder
mehreren mit dem Analyten bindefähigen Reagenzien, d.h. Rezeptoren, die
bevorzugt aus Proteinen, Peptiden, Antikörpern, Antigenen, Haptenen und
Nukleinsäuren ausgewählt werden.

20

Während ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens
zunächst darin besteht, die Sensitivität des Nachweises eines einzigen
Analyten zu verbessern, können bei geeigneter Wahl der Testflächen auch
mehrere Analyten gleichzeitig mit hoher Sensitivität bestimmt werden.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase zum
Nachweis eines Analyten in einer Probe, welche dadurch gekennzeichnet
ist, daß sie einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich
getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils
30 unterschiedliche Reagenzien enthalten, die spezifisch mit dem zu
bestimmenden Analyten bindefähig sind.

Bevorzugt enthalten die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien, die an verschiedene Epitope oder/und Subtypen eines Analyten oder/und an verschiedene Analyttypen binden.

- 5 Um eine möglichst große Anzahl von Testflächen auf einer Festphase unterzubringen, werden bevorzugt miniaturisierte Testformate verwendet. Der Abstand zwischen den einzelnen Testflächen wird so gewählt, daß ein Ineinanderlaufen der aufgetragenen Reagenzien nicht möglich ist. Üblicherweise reicht es hierfür aus, wenn die Ränder der Testflächen einen
10 Abstand von 0,05 bis 5 mm aufweisen. Zwischen den Testflächen befindet sich bevorzugt eine inerte Oberfläche, die weder mit dem Analyten noch mit sonstigen Probestandteilen bindefähig ist.

- Die erfindungsgemäße Festphase kann in beliebigen Nachweisverfahren
15 eingesetzt werden, z.B. in Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays, Zucker-Lectin-Assays und dergleichen. Bevorzugt wird sie in einem Immunoassay zum Nachweis von Antikörpern oder/und Antigenen verwendet.

- 20 Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Testkit zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, welches eine erfindungsgemäße Festphase sowie markierte Nachweisreagenzien umfaßt. Markierte Nachweisreagenzien sind dem Fachmann bekannt und umfassen im allgemeinen eine Markierungsgruppe sowie eine spezifisch bindefähige Gruppe, die den Nachweis des Analyten
25 ermöglicht. Geeignete Markierungsgruppen sind z.B. Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-, Enzym-, radioaktive oder Partikel-(Sol)-Markierungsgruppen. Die spezifisch bindefähige Gruppe kann z.B. mit dem gebildeten Analytkomplex bindefähig sein oder bei kompetitiven Testformaten mit anderen Bestandteilen des Nachweissystems. Bevorzugt
30 umfaßt der Testkit ein universelles Konjugat als Nachweisreagenz, insbesondere fluoreszenzmarkierte Latexpartikel, welches mit den für den Analyten spezifischen Nachweisrezeptoren bindefähig ist.

Ein weiteres Problem herkömmlicher Routinetests besteht darin, daß die gleichzeitige Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer Messung nicht durchführbar ist. Aus diesem Grund wird bei sogenannten HIV-Kombinationstests
5 beispielsweise eine Bestimmung des Antigens p24 und von Antikörpern gegen andere HIV-Antigene gleichzeitig durchgeführt. Bei einem solchen Test können dann lediglich Antikörper gegen andere HIV-Antigene, wie beispielsweise gp41 oder gp120 bestimmt werden, während die Bestimmung von Antikörpern gegen p24 nicht möglich ist.

10

US-PS-5,627,026 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis eines Antikörpers und eines Antigens in einer biologischen Probe. So wird beispielsweise ein Assay zur Bestimmung des FeLV-Antigens und des FIV-Antikörpers beschrieben. Auch gemäß dem Verfahren von US-PS-5,627,026 können bei
15 der Bestimmung eines Antigens im gleichen Test lediglich Antikörper, die gegen andere Antigene gerichtet sind, nachgewiesen werden.

20

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer Probe bereitzustellen. Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren umfassend die Schritte

25

(a) Bereitstellen einer Festphase, auf der in einer ersten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antigen bindefähiger immobilisierter Rezeptor und in einer räumlich davon getrennten zweiten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähiger immobilisierter Rezeptor aufgebracht ist,

30

(b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und

- 14 -

(c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Antigens und des Antikörpers durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

5 Der Nachweis des Antigens findet bevorzugt unter Verwendung eines Sandwichtests und der Nachweis des Antikörpers bevorzugt unter Verwendung eines Brückenkonzepts, eines Rücktitrationskonzepts oder eines indirekten Testformats statt.

10 Bevorzugt wird der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung einer Rücktitration durchgeführt. Vorteilhaft ist dabei, daß bei gleichzeitiger Verwendung eines Sandwichtests zum Nachweis des Antigens keine gegenseitige Beeinflussung von Nachweismolekülen stattfinden kann, da in diesem Fall für den Nachweis des Antigens und den Nachweis des
15 Antikörpers das gleiche Nachweisreagenz verwendet werden kann. Für einen Sandwichtest zum Nachweis eines Antigens, z.B. HIV-p24, wird beispielsweise ein gegen dieses Antigen gerichteter Antikörper auf einer Testfläche immobilisiert. Als zum Nachweis dienender freier Rezeptor kann dann ein zweiter gegen das Antigen gerichteter, direkt oder indirekt
20 markierter Antikörper, z.B. ein digoxigenylierter Anti-p24-Antikörper, verwendet werden. Zum Nachweis des entsprechenden, gegen das Antigen gerichteten Antikörpers, z.B. eines Anti-p24-Antikörpers, unter Verwendung einer Rücktitration wird ein mit dem Antikörper bindefähiges Antigen, z.B. p24, oder ein Fragment davon, auf einer weiteren Testfläche immobilisiert.
25 Als Nachweisreagenz dient ebenfalls der zweite gegen das Antigen gerichtete markierte Antikörper, z.B. ein digoxigenylierter Anti-p24-Antikörper, welcher mit dem Analyten, das ist beispielsweise der in der Probe vorhandene natürliche Anti-p24-Antikörper um die Bindung an das immobilisierte Antigen kompetiert. So kann für den bevorzugten
30 gleichzeitigen Nachweis eines p24-Antigens und des dagegen gerichteten Anti-p24-Antikörpers jeweils das gleiche Nachweisreagenz, beispielsweise ein digoxigenylierter Anti-p24-Antikörper verwendet werden.

Wenn der Nachweis des Antigens durch einen Sandwichtest und der parallele Nachweis des Antikörpers durch einen Brückentest oder einen indirekten Test erfolgt, müssen spezielle Testreagenzien verwendet werden, um eine wechselseitige Beeinflussung der Nachweisreagenzien auszuschließen. Bei einem indirekten Test zum Nachweis eines Antikörpers, z.B. eines Anti-p24-Antikörpers, wird beispielsweise ein Antigen, für das der nachzuweisende Antikörper spezifisch ist, z.B. p24, auf einer Testfläche immobilisiert. Zum Nachweis des Antikörpers wird dann ein markierter Antikörper, der zwar den nachzuweisenden Antikörper, aber nicht das immobilisierte Antigen erkennt, beispielsweise ein digoxigenylierter Anti-Human IgG-Antikörper verwendet. Bei der parallelen Antigenbestimmung im Sandwich-Format können auf der Nachweiseite ein oder mehrere Antikörper, bevorzugt monoklonale Antikörper, eingesetzt werden, deren Epitopbindestellen bekannt sind. Gleichzeitig können bei der Antikörper-Bestimmung im indirekten Testformat oder im Brückenformat keine nativen oder rekombinanten Antigene verwendet werden, die mit dem Nachweisantikörper bindefähigen Epitope enthalten, da sonst eine unerwünschte Reaktion stattfindet. Statt dessen müssen vorbestimmte, rekombinante Antigene oder Peptidantigene ohne diese Epitopbindestellen verwendet werden, an die der oder die eingesetzten Nachweisantikörper nicht bindefähig sind.

Durch die erfindungsgemäße Multiepitopanalyse mit Arraysystemen ist es möglich, eine Kombination von Antigen- und Antikörper-Nachweisen für ein bestimmtes Antigen und einen gegen dieses bestimmte Antigen gerichteten Antikörper durchzuführen. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, die bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren bestehende diagnostische Lücke zwischen dem ersten Auftreten eines Antigens und dem zeitlich versetzten Auftreten von Antikörpern zu schließen und eine Probe sehr früh als positiv bzw. negativ einzustufen. Üblicherweise werden Proben von Patienten genommen, wobei die Sensitivität eines Tests durch eine möglichst frühe Erkennung von positiven Proben bestimmt wird. Bei einer Infektion treten

die verschiedenen Marker, die diese Infektionen anzeigen, wie beispielsweise Antigene oder gegen diese Antigene gerichteten Antikörper mit unterschiedlichem zeitlichen Verlauf auf.

5 Das erfindungsgemäße Multi-epitop-Verfahren mit einer Arrayanordnung ermöglicht zudem durch die räumlich getrennte Anordnung der einzelnen Testflächen eine spezifische Unterscheidung zwischen Antigen- und Antikörpertests. Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insbesondere bei HIV-Tests erkennbar. Ein bevorzugtes Beispiel für das
10 erfindungsgemäße Verfahren ist der gleichzeitige Nachweis eines HIV-Antigens und dagegen gerichteten Antikörper z.B. des p24-Antigens und des entsprechenden Anti-p24-Antikörpers. Bei einer HIV-Infektion treten zuerst p24-Antigene auf. Diese können mit einem Antigentest, nicht jedoch mit einem Antikörpertest nachgewiesen werden. Nach dem Auftreten der
15 Antigene werden im Körper Antikörper gegen diese Antigene gebildet. Bei den herkömmlichen Kombitests ist es jedoch nicht möglich, den p24-Antigentest mit einem Anti-p24-Antikörpertest zu kombinieren, vielmehr findet eine Kombination des p24-Antigentests mit einem Anti-gp41-Antikörpertest statt. Da die Bildung von Anti-gp41-Antikörpern zeitlich
20 jedoch nach der Bildung von Anti-p24-Antikörpern erfolgen kann, können im Zeitraum bis zur Bildung der Anti-gp41-Antikörper bei herkömmlichen Verfahren falsch negative Ergebnisse erhalten werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist demgegenüber sicherer, da auch Anti-p24-Antikörper, bestimmt werden können.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt wird die bindefähige Beschichtung der ersten Testfläche, in der das Antigen nachgewiesen werden soll, aus immobilisierten Antikörpern gebildet, die spezifisch für Epitope des nachzuweisenden Antigens sind. Aufgrund der bevorzugt verwendeten
30 Arraystruktur ist es möglich, mehrere Antikörper, die für unterschiedliche Subtypen des nachzuweisenden Antigens spezifisch sind, in separaten Testflächen aufzubringen. Die Antikörper werden entsprechend dem zu

analysierenden Antigen ausgewählt. Beim Screening auf eine virale Infektion werden bevorzugt Anti-HIV-I-Antikörper, Anti-HIV-II-Antikörper, Anti-HBV-Antikörper oder/und Anti-HCV-Antikörper getestet. Analog umfaßt die bindefähige Beschichtung der weiteren Testflächen, auf der ein Antikörper nachgewiesen werden soll, bevorzugt Antigene, die spezifisch für den nachzuweisenden Antikörper sind. Auch hier können grundsätzlich beliebige, auf den jeweiligen Test abgestimmte Antigene verwendet werden, bevorzugt werden Antigene oder Epitope davon aus HIV-I, HIV-II, HBV oder/und HCV verwendet.

10

Durch die Verwendung einer nichtporösen Festphase können besonders gute Ergebnisse mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden. Eine nichtporöse Festphase bietet insbesondere Vorteile beim Aufbringen der Testreagenzien, wobei ein definiertes Aufbringen ohne Ineinanderfließen der einzelnen Testflächen möglich ist. Weiterhin ist es bei Verwendung von nichtporösen Testphasen möglich, das Testformat zu miniaturisieren. Bei miniaturisierten Testformaten ist es möglich, eine Vielzahl von Testflächen auf eine einzige nichtporöse Festphase aufzubringen.

20

Der Nachweis der Bindung eines Antigens oder Antikörpers an die Testflächen wird bevorzugt unter Verwendung von markierten Antikörpern durchgeführt, die gegen den Analyten gerichtet sind. Beim Nachweis des Antigens im Sandwichformat wird dabei ein gegen dieses Antigen gerichteter markierter Antikörper verwendet. Der gleiche markierte Antikörper dient auch zum Nachweis des Analyten-Antikörpers beim kompetitiven Format, z.B. einer Rücktitration. Durch räumlich getrennte Auswertung der einzelnen Testflächen ist es somit möglich, mit einem einzigen Nachweisreagenz sowohl Antigen als auch den für dieses Antigen spezifischen Antikörper nachzuweisen, ohne daß sich die beiden Nachweisverfahren gegenseitig beeinträchtigen würden. Geeignete Markierungssubstanzen zur Markierung von Antikörpern sind dem Fachmann bekannt und umfassen z.B. fluoreszierende Gruppen, chemilumineszierende

30

Gruppen, radioaktive Markierungen, Enzymmarkierungen, farbige Markierungen und Solpartikel. Bevorzugt ist die Verwendung eines universellen Nachweisreagenzes, insbesondere von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln, welche z.B. mit den Nachweisrezeptoren bindefähig ist.

5

Besonders gute Ergebnisse werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten, wenn die spezifisch bindefähigen Beschichtungen auf die einzelnen Testflächen separat aufgebracht werden. Dadurch ist es möglich, die Bindekapazität der einzelnen Testflächen optimal auszunutzen und optimal
10 bindefähige Beschichtungen herzustellen. Gegebenenfalls können die bindefähigen Reagenzien durch Verdünnermoleküle verdünnt werden, um die Bindefähigkeit der Beschichtung weiter zu verbessern. Geeignete Verdünnermoleküle sind Moleküle, die nicht mit dem zu bestimmenden Analyten binden und die auch keine unspezifische Wechselwirkung oder
15 Bindung zu anderen Probenbestandteilen zeigen, was zu falschpositiven Ergebnissen führen könnte (vgl. WO92/10757, EP O 664 452 A2). Besonders bevorzugt wird die Beschichtung in den einzelnen Testflächen jeweils aus einem einzigen spezifisch bindefähigen Molekültyp gebildet. Unterschiedliche, mit dem Analyten bindefähige Reagenzien werden dabei
20 in verschiedene Testspots aufgebracht. Auf diese Weise ist es möglich, die Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter zu erhöhen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses
25 Antigen gerichteten Antikörpers, umfassend mindestens eine erste Testfläche und mindestens eine zweite Testfläche, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß die erste Testfläche eine spezifisch mit einem Antigen bindefähige Beschichtung aufweist und die zweite Testfläche eine spezifisch mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper bindefähigen
30 Beschichtung aufweist, wobei die Beschichtungen homogen sind und jeweils nur einen einzigen Typ eines bindefähigen Reagenz enthalten. Die Beschichtungen sind gleichmäßig auf die Testflächen aufgebracht, das

heißt, sie sind homogen. Neben dem bindefähigen Reagenz können die Testflächen inerte Verdünnermoleküle umfassen, die weder mit dem nachzuweisenden Analyten noch mit anderen Probenbestandteilen Wechselwirkungen eingehen können.

5

Während grundsätzlich beliebige Trägermaterialien verwendet werden können, sind die Testflächen der erfindungsgemäßen Festphase bevorzugt auf einen nichtporösen Träger aufgebracht. Durch die Verwendung von nichtporösen Oberflächen ist insbesondere eine Miniaturisierung des Testformates und die gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl von Testflächen.

10

Die erfindungsgemäße Festphase eignet sich insbesondere zur Verwendung in einem Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers. Auf diese Weise ist es möglich, die Sensitivität und Zuverlässigkeit von Immuntests weiter zu verbessern.

15

Die Erfindung umfasst auch einen Testkit zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers, welches die erfindungsgemäße Festphase sowie markierte Nachweisreagenzien zum Nachweis von an die Testflächen gebundenem Antigen und Antikörper umfasst. Geeignete Nachweisreagenzien sind beispielsweise markierte Antikörper, wobei die Markierung aus den oben genannten Gruppen ausgewählt sein kann.

20

25

Ein weiteres Problem bei den bisher verfügbaren Routentests besteht darin, daß alle für einen Test, beispielsweise einen HIV-Test, notwendigen Antigene und Antikörper gemischt werden und für das Nachweisverfahren eine für dieses Gemisch optimale Cut-Off-Grenze festgelegt wird. Durch die Verwendung einer gemeinsamen Cut-Off-Grenze für alle Parameter wird die Cut-Off-Grenze jedoch durch die unspezifische Bindung des schlechtesten

30

Einsatzstoffes bestimmt und begrenzt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

- 5 (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,
- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem
10 freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen, wobei ein Signal oberhalb eines vorbestimmten Testflächen-
15 spezifischen Grenzwertes als positiv und unterhalb eines vorbestimmten Testflächen-spezifischen Grenzwertes als negativ klassifiziert wird.

Durch die Verwendung von vorbestimmten Testflächen-spezifischen
20 Grenzwerten für jede einzelne Testfläche ist es möglich, die Spezifität von Nachweisverfahren deutlich zu verbessern, während die Sensitivität unverändert hoch bleibt. Der Grenzwert oder Cut-Off-Wert wird mittels der Größen Signal der Probe, Hintergrund der Probe und Hintergrund einer Negativkontrolle bestimmt. Eine übliche Berechnung des Cut-Off-Wertes
25 (COI) erfolgt beispielsweise nach der Formel:

$$\text{COI} = \text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}} / n \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}$$

Ein üblicher Wert für n beträgt beispielsweise 2. Der Faktor n - und damit
30 der Cut-Off-Wert - kann für bestimmte Testflächen heraufgesetzt werden, bei denen falschpositive Proben beobachtet werden, wobei n eine Zahl zwischen 2 und 100, bevorzugt zwischen 2 und 10 sein kann.

Bevorzugt werden die Grenzwerte jeweils individuell für eine Testfläche bestimmt. Dies bedeutet, daß für die unterschiedlichen Testflächen unterschiedliche Grenzwerte bzw. Cut-Off-Werte festgelegt werden, insbesondere werden die Grenzwerte für mindestens zwei Testflächen unterschiedlich festgelegt. Bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens machen von den oben beschriebenen Merkmalen Gebrauch.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

10 **Beispiele**

1. **Test auf Anti-HIV-Antikörper mit mehreren Antigen-spezifischen Testflächen mittels Microspot-Technologie**

Microspot ist eine miniaturisierte ultrasensitive Technologie, die ideal zur gleichzeitigen Bestimmung von verschiedenen Parametern in einem einzigen Meßvorgang geeignet ist. Im Fall der Bestimmung von Anti-HIV-Antikörpern werden verschiedene HIV-Nachweisantigene in sogenannten "Arrays" jeweils einzeln mittels einer Inkjet-Methode auf eine Testfläche (Spot) auf einem Polystyrolträger aufgebracht. Bei der Testdurchführung werden 30 µl mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnte Probe auf den mit Testflächen versehenen Träger pipettiert und 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und Waschen mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung 1, die eine Mischung aller Digoxigenin-markierten HIV-Antigene enthält, zugegeben und wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Reagenzlösung 1 und Waschen mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung 2 mit Nachweisreagenz zugegeben. Als universelles Nachweisreagenz dienen 100 nm große, fluoreszierende Latexpartikel, die kovalent mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper beschichtet sind.

- 22 -

Dieses Nachweisreagenz wird wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und trockengesaugt. Die Testflächen werden dann mit einem He-Ne-Laser mit 633 nm Wellenlänge bestrahlt und die Fluoreszenz bei 670 nm Wellenlänge mit einer CCD-Kamera vermessen.

Die Festphase enthält spezifische Testflächen mit folgenden immobilisierten Antigenen:

- rekombinantes p24 Polypeptid
- rekombinante Reverse Transkriptase (RT)
- gp41-Peptid 1
- gp41-Peptid 2

Als Probenpuffer wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 7,6 mit folgenden Zusätzen verwendet: 0,05% Tween 20, 0,5% Rinderserumalbumin (RSA), 0,1% Rinder-IgG, 0,01% Methylisothiazolon, 3% Pepton.

Als Reagenzlösung 1 wurde der oben beschriebene Probenpuffer verwendet, der folgende testspezifische Antigene enthält:

- Digoxigenin-markiertes, rekombinantes p24
- Digoxigenin-markierte, rekombinante Reverse Transkriptase
- Digoxigenin-markiertes gp41-Peptid 1
- Digoxigenin markiertes gp41-Peptid 2

Als Reagenzlösung 2 wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit folgenden Zusätzen verwendet: 0,05% Tween 20, 0,9% NaCl, 0,5% RSA, 0,1% Na-azid und 0,01% von fluoreszenzmarkierten, einem monoklonalen Anti-Digoxigenin-Antikörper beschichteten Latexpartikeln.

2. Vergleich eines Anti-HIV-Antikörper-Tests im Microspot-Format zu konventionellen Methoden

In diesem Versuch wurden sogenannte Serokonversionsproben vermessen. Diese Proben sind zeitlich aufeinanderfolgende Abnahmen verschiedener Personen, deren Serumbefund von HIV-negativ nach HIV-positiv konvertiert. Je sensitiver eine Testmethode ist, desto früher kann ein HIV-spezifisches Antikörper-Signal nachgewiesen werden. Die Proben wurden mit der erfindungsgemäßen Methode (Microspot) und vergleichend mit einer bekannten Methode (Enzymun® von Boehringer Mannheim) vermessen. Die dabei verwendeten, HIV-spezifischen Einsatzstoffe waren in beiden Testsystemen identisch, die sich daher vor allem nur durch die getrennte Einzelspot-Analyse unterscheiden. In der nachfolgenden Tabelle sind die Cut-off-Indices (Cut-off-Index = $\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Untergrund}} / 2 \times \text{Signal}_{\text{Negativkontrolle}}$) der beiden Methoden aufgetragen und zusätzlich mit Westernblot-Daten verglichen:

Serokonversions- Panel der Fa. BBI	Tag der Abnahme	p24	RT	gp41- Peptid 1	gp41- Peptid 2	Western- Blot	Enzymun®
R 2. Abnahme	2	0.0	0.0	0.0	1.3	negativ	0.5
3. Abnahme	7	22.2	0.0	0.0	2.4	indifferent	15.4
4. Abnahme	13	17.4	2.6	4.4	36.4	positiv	36.0
AB 1. Abnahme	0	0.0	0.0	0.6	0.0	negativ	0.3
2. Abnahme	28	0.0	0.0	0.4	1.1	negativ	0.7
3. Abnahme	33	0.0	0.0	5.5	54.4	negativ	24.2
4. Abnahme	35	0.8	0.2	6.0	33.2	positiv	26.7
5. Abnahme	37	15.2	5.1	4.6	33.0	positiv	28.9
AD 5. Abnahme	21	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.3
6. Abnahme	25	0.2	0.0	1.6	3.7	positiv	0.9
7. Abnahme	28	14.1	0.3	11.1	65.5	positiv	24.5
AG 3. Abnahme	13	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.4
4. Abnahme	27	0.0	0.0	0.0	1.1	negativ	0.6
5. Abnahme	34	6.0	5.3	0.0	106.9	positiv	8.1
6. Abnahme	50	6.1	5.4	0.0	65.4	positiv	3.1
7. Abnahme	78	1.0	6.8	0.0	23.9	positiv	1.6
8. Abnahme	163	1.5	5.3	0.0	4.9	positiv	0.6
9. Abnahme	194	2.3	2.5	0.0	2.8	positiv	0.7
AI 1. Abnahme	0	0.0	0.0	1.2	0.1	indifferent	0.8
2. Abnahme	7	0.6	0.5	54.7	44.9	positiv	30.2
3. Abnahme	11	1.1	0.7	18.8	22.5	positiv	30.2

- 24 -

Dieser Vergleich zeigt, daß durch die Aufteilung in Einzelspots mit jeweils optimalen Antigenkonzentrationen die Sensitivität im Vergleich zu bekannten Tests deutlich verbessert werden konnte. Von den 5 Serokonversions-Panels werden 7 Abnahmen früher positiv erkannt. Dies entspricht je nach
5 Panel einer früheren Detektion der HIV-Infektion von 3 bis 7 Tagen. Auch im Vergleich zum Westernblot wurde eine deutliche Steigerung der Sensitivität mit 6 früher erkannten Abnahmen erreicht.

3. Vergleich einer kombinierten Bestimmung von HIV p24-Antigen sowie
10 Anti-gp41- und Anti-RT-Antikörpern im Microspotformat zu konventionellen Methoden

Zur Evaluierung der Sensitivität wurden wiederum sogenannte Serokonversionsproben vermessen. Die Bestimmung erfolgte mit der
15 erfindungsgemäßen Methode (Microspot) und die dabei erhaltenen Daten wurden mit den derzeit besten verfügbaren Anti-HIV-Tests (siehe Datenblätter der Hersteller von Serokonversionspanels, z.B. Firma BBI) bzw. mit dem Enzymun®-Kombinationstest von Boehringer Mannheim (kombinierte Bestimmung von p24-Antigen und Anti-HIV-Antikörpern) verglichen.

20

Für das Microspotttestformat wurden folgende (wie in Beispiel 1 hergestellte) Testflächen (Einzelspots) verwendet:

- monoklonaler Anti-p24-Antikörper A zur Bestimmung des p24-
25 Antigens von HIV Subtyp B
- monoklonaler Anti-p24-Antikörper B zur Bestimmung des p24-Antigens von HIV Subtyp B und O
- gp41-Peptid 1 zur Bestimmung von Antikörpern gegen gp41
- gp41-Peptid 2 zur Bestimmung von Antikörpern gegen gp41
- 30 - rekombinante Reverse Transkriptase (RT) zur Bestimmung von Antikörpern gegen RT

Die im Mikrosport-Test verwendeten HIV-spezifischen Einsatzstoffe waren vergleichbar mit den im Enzymun"-Test verwendeten Einsatzstoffen, so daß sich der Microspot-Test von Enzymun"-Methode vor allem nur durch die getrennte Einzelspotanalyse unterscheidet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Cut-Off-Indices (Bestimmung siehe Beispiel 2) der beiden Methoden aufgelistet und zusätzlich mit den bisher bekannten sensitivsten Anti-HIV-Tests verglichen.

Serokonversions-Panel (Fa. BBI ^{xx})	MAK <p24> A	MAK <p24> B	RT	gp41-Peptid 1	pg41-Peptid 2	sensitivster <HIV>-Test	Enzymun Kombi
Q 1. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	negativ	0.30
2. Abnahme	24.4	48	0.0	0.0	0.0	negativ	0.66
3. Abnahme	246	435	0.0	0.0	0.0	negativ	3.47
4. Abnahme	nd	nd	nd	nd	nd	positiv	2.30
W 6. Abnahme	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	negativ	0.30
7. Abnahme	0.5	1.1	0.0	0.0	0.1	negativ	0.32
8. Abnahme	5.8	14.1	0.1	0.0	0.1	negativ	0.41
9. Abnahme	529	806	0.0	0.0	0.0	positiv	10.1
Z 2. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.31
3. Abnahme	20	25.5	0.1	0.0	0.1	negativ	0.61
4. Abnahme	226	262	0.0	0.0	0.0	negativ	2.96
5. Abnahme	0.9	1.1	3.7	82.6	277	positiv	18.0
AD 2. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	negativ	0.30
3. Abnahme	2.5	6.4	0.1	0.0	0.1	negativ	0.33
4. Abnahme	96.8	200	0.0	0.0	0.0	negativ	1.5
5. Abnahme	663	832	0.0	0.0	0.0	positiv	> 23.3
6. Abnahme	549	709	0.6	2.7	2.8	positiv	> 23.3
AF 3. Abnahme	0.1	0.6	0.2	0.0	0.2	negativ	0.31
4. Abnahme	0.4	1.7	0.0	0.0	0.02	negativ	0.30
5. Abnahme	2.1	4.6	0.02	0.0	0.0	negativ	0.34
6. Abnahme	31.2	61.6	0.1	2.9	204	positiv	18.0

xx BBI Boston Biomedica Inc.

- 26 -

Dieser Vergleich zeigt, daß die kombinierte Bestimmung von p24-Antigen und HIV-Antikörpern durch das Microspot-Testformat im Vergleich zu konventionellen Methoden deutlich verbessert werden kann. So ist der kombinierte Microspot-Test um ein Vielfaches sensitiver als der Enzymun®-Kombitest, bei dem alle Antigene und Antikörper in gemischter Form vorliegen. Bei den geprüften fünf Serokonversionspanels wurden im Vergleich zum sensitivsten Antikörpertest neun Abnahmen, im Vergleich zum Enzymun®-Kombitest immer noch sechs Abnahmen früher positiv detektiert.

4. Kombinierte Bestimmung von p24-Antigen und Anti-p24-Antikörpern nach dem Rücktitrationsprinzip

Zur kombinierten Bestimmung des p24-Antigens und von Antikörpern gegen p24 im selben Array-System wurde ein p24-Antigen-Test im Sandwichformat und ein Anti-p24-Antikörper-Test im Rücktitrationsformat durchgeführt.

Es wurden Arrays mit folgenden p24-spezifischen Reagenzien jeweils auf Einzelspots (siehe Beispiel 1) hergestellt:

(a) Panel mit p24-Antigen und Anti-p24-Antikörper-Test:

(i) p24-Antigen-Test:

Testfläche 1:	monoklonaler Anti-p24-Antikörper A Fab'-Fragment, biotinyliert (100 µg/ml)
Testfläche 2:	monoklonaler Anti-p24-Antikörper B Fab'-Fragment, biotinyliert (100 µg/ml)

(ii) Anti-p24-Test im Rücktitrationskonzept:

Testfläche 3:	biotinyliertes p24-Antigen (0,3 µg/ml)
---------------	--

- 27 -

- (b) Vergleichspanel mit Anti-p24-Antikörpertest im Brückenkonzept:
- biotinyliertes p24-Antigen (14 $\mu\text{g/ml}$)

Bei der Testdurchführung wurden zu jedem Panel 30 μl mit Probenpuffer im
5 Verhältnis 1:1 verdünnte Probe pipettiert und 45 min unter Schütteln bei
37°C Inkubationstemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und
Waschen mit Waschpuffer wurden 30 μl Reagenzlösung 1, die eine
Mischung aller Digoxigenin-markierten HIV-Antigene und HIV-Antikörper
enthält, zugegeben und 10 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert.
10 Folgende p24-spezifische Reagenzien wurden eingesetzt:

- (a) Panel mit p24-Antigen- und Anti-p24-Antikörper-Test:
- monoklonaler Anti-p24-Antikörper D F(ab')₂-Fragment,
digoxigenyliert (500 ng/ml)
 - 15 - monoklonaler Anti-p24-Antikörper E F(ab')₂ Fragment,
digoxigenyliert (500 ng/ml)
- (b) Vergleichspanel mit Anti-p24-Antikörpertest im Brückenkonzept:
- digoxigenyliertes p24-Antigen (30 ng/ml)

20

Nach Absaugen der Reagenzlösung 1 und Waschen mit Waschpuffer
wurden 30 μl Reagenzlösung 2 mit Nachweisreagenz (siehe Beispiel 1)
zugegeben. Dieses Nachweisreagenz wurde 5 min unter Schütteln bei 37°C
inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

25

Das Testfeld wurde mit einem He-Ne-Laser der Wellenlänge 633 nm
bestrahlt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 670 nm mit einem
konfokalen Laser-Scanner vermessen.

30 Mit beiden Panels wurden vergleichend 11 für HIV negative und 19 für HIV
positive Proben vermessen: Die Cut-Off Indices (COI) für beide Testformate
sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Probennummer	COI <p24> Rücktitration*	-COI <p24> Brückenformat**
Negativkontrolle	2412 Cts	93 Cts
Positivkontrolle	1276 Cts	24651 Cts
Negativprobe 145	1.39	0.3
Negativprobe 196	1.54	0.2
Negativprobe 122	1.43	0.1
Negativprobe 160	1.41	0.2
Negativprobe 141	1.28	0.2
Negativprobe 168	1.58	0.2
Negativprobe 222	1.38	0.2
Negativprobe 280	1.42	0.2
Negativprobe 232	1.32	0.2
Negativprobe 201	1.54	0.3
Negativprobe 211	1.33	0.2
Positivprobe 154	0.31	534
Positivprobe 132	0.47	537
Positivprobe 130	0.42	547
Positivprobe 138	0.46	473
Positivprobe 163	0.47	591
Positivprobe 176	0.39	505
Positivprobe 204	0.39	531
Positivprobe 167	0.39	588
Positivprobe 221	0.79	351
Positivprobe 174	0.30	506
Positivprobe 285	0.43	506
Positivprobe 150	0.76	422
Positivprobe 179	0.58	596
Positivprobe 236	0.55	573
Positivprobe 337	0.60	491
Positivprobe 203	0.35	573
Positivprobe 147	0.72	610
Positivprobe 285	0.47	584
Positivprobe 289	0.30	496

* $COI = \frac{Signal_{Probe} - Signal_{Untergrund}}{0,7 \times Signal_{Negativkontrolle}}$; $COI > 1,0 = \text{negativ}$

** $COI = \frac{Signal_{Probe} - Signal_{Untergrund}}{2 \times Signal_{Negativkontrolle}}$; $COI > 1,0 = \text{positiv}$

Sowohl alle negativen als auch alle positiven Proben konnten mit dem Rücktitrationsprinzip richtig detektiert werden. Durch die wechselwirkungsfreie Kombination von p24-Antigen- und Anti-p24-Antikörper-Tests können Serokonversionsproben früher detektiert werden und die Sicherheit vor falsch negativen Detektionen zusätzlich erhöht werden.

5. Verbesserung der Testspezifität durch Testflächen-spezifische Cut-Off-Berechnung

In bisher verfügbaren Routinetests werden alle für die Bestimmung notwendigen Antigene und Antikörper vermischt und eine für dieses Gemisch optimale Cut-Off-Grenze festgelegt. Diese wird durch die unspezifische Bindung des "schlechtesten" Einsatzstoffes bestimmt. Durch die erfindungsgemäße Microspot-Technologie kann man hingegen eine Testflächen-spezifische Cut-Off-Berechnung, die für jeden Einsatzstoff spezifisch ist, durchführen.

Bei identischer Berechnung des Cut-Off-Werts ($COI = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{2 \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$) der einzelnen Testflächen konnte mit dem HIV-Kombinationstest (Beispiel 3) in 1264 Proben folgende Spezifität erreicht werden:

- p24-Antigen: 100%
- Anti-HIV-Antikörper-Test: 99,52% (sechs falsch positive Bestimmungen)

Da die falsch positiven Bestimmungen ausschließlich in den beiden Testflächen für gp41 Peptid 2 und Reverse Transkriptase auftraten, wurden die Cut-Off-Grenzen für diese Testflächen auf folgende Grenzwerte heraufgesetzt:

- 30 -

gp41-Peptid 2: $COI = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{5 \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$

RT: $COI = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{3 \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$

- 5 Auf diese Weise konnte die Spezifität des HIV-Tests von 99,52% auf 99,92% (nur noch eine einzige falsch positive Bestimmung) verbessert werden. Auch die Sensitivität des Tests blieb unbeeinflusst, da der Cut-Off-Index des sensitiven p24-Antigentests nicht verändert wurde. So kann bei unverändert hoher Sensitivität eine deutliche Verbesserung der Spezifität
- 10 erzielt werden.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend
5 die Schritte:
 - (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,
 - 10 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
 - (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des
15 Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß der nachzuweisende Analyt eine homogene oder heterogene Population darstellt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß der Analyt eine heterogene Antikörperpopulation, ein Antigengemisch oder ein Gemisch von gegebenenfalls unterschiedlichen Antigenen und Antikörpern darstellt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm aufweisen.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase durch separates, direktes spezifisches Aufbringen
der unterschiedlichen analytspezifischen Rezeptoren auf die räumlich
5 getrennten Testflächen hergestellt wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtung auf den Testflächen jeweils aus einem einzigen
10 bindefähigen Molekültyp gebildet wird.
7. Verfahren nach einem vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Festphase verwendet, die zusätzlich mindestens eine
15 Kontrollfläche umfaßt, die keinen analytspezifischen Rezeptor enthält.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß zum Nachweis aus dem Analyten und damit bindefähigen
20 Reagenzien gebildeten Komplexen ein universelles Nachweisreagenz,
insbesondere markierte Latexpartikel verwendet werden.
9. Festphase zum Nachweis eines Analyten in einer Probe,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß sie einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich
getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils
unterschiedliche Reagenzien enthalten, die spezifisch den zu
bestimmenden Analyten binden.

- 33 -

10. Festphase nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien enthalten,
die an verschiedene Epitope oder/und Subtypen des Analyten
5 oder/und an verschiedene Analyttypen binden.
11. Festphase nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der nichtporöse Träger aus Polystyrol gebildet ist.
- 10 12. Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.
- 15 13. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 12 in
einem Immunoassay.
14. Testkit zum Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend eine
20 Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 12 sowie markierte
Nachweisreagenzien.
15. Testkit nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß er als universelles Nachweisreagenz markierte Latexpartikel
enthält.
16. Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines
spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer
30 Probe, umfassend die Schritte:
(a) Bereitstellen einer Festphase, auf der in einer ersten Testfläche
ein mit dem zu bestimmenden Antigen bindefähiger

- 34 -

immobilisierter Rezeptor und in einer räumlich davon getrennten zweiten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähiger immobilisierter Rezeptor aufgebracht ist,

- 5 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Antigens und des Antikörpers durch Bestimmung der
- 10 signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antigens unter Verwendung eines Sandwich-
- 15 Tests durchgeführt wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines
- 20 Rücktitrationskonzepts durchgeführt wird.

19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines
- 25 Brückenkonzepts durchgeführt wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines indirekten
- 30 Testformats durchgeführt wird.

- 35 -

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die bindefähige Beschichtung der ersten Testfläche aus
immobilisierten Antikörpern gebildet wird, die spezifisch für ein Epitop
des nachzuweisenden Antigens sind.
22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß Antikörper, die für unterschiedliche Subtypen des
nachzuweisenden Antigens spezifisch sind, in separaten Testflächen
aufgebracht werden.
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper ausgewählt wird aus viralen Antikörpern,
insbesondere Anti-HIV-I-Antikörpern, Anti-HIV-II-Antikörpern, Anti-
HBV-Antikörpern und Anti-HCV-Antikörpern.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß die bindefähige Beschichtung der zweiten Testfläche aus
Antigenen gebildet wird, die spezifisch für den nachzuweisenden
Antikörper sind.
25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Antigene ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus
HIV-I, HIV-II, HBV und HCV.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem zu bestimmenden Antigen um HIV p24 und bei
dem zu bestimmenden Antikörper um Anti-p24 handelt.
- 5 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine nichtporöse Festphase verwendet wird.
- 10 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis unter Verwendung von markierten Antikörpern, die
gegen die Analyten gerichtet sind, durchgeführt wird.
- 15 29. Verfahren nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung ausgewählt wird aus fluoreszierenden Gruppen,
chemilumineszierenden Gruppen, radioaktiven Markierungen,
Enzymmarkierungen, farbigen Markierungen und Solpartikeln.
- 20 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis unter Verwendung eines universellen
Nachweisreagenz, insbesondere markierten Latexpartikeln,
25 durchgeführt wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase durch direktes, separates Aufbringen der
30 spezifisch bindefähigen Beschichtungen auf die einzelnen Testflächen
hergestellt wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtung auf den Testflächen jeweils aus einem einzigen
bindefähigen Molekültyp gebildet wird.
- 5
33. Festphase, zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines
spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer
Probe, umfassend mindestens eine erste Testfläche und mindestens
eine zweite Testfläche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste Testfläche eine spezifisch mit einem Antigen
bindefähige Beschichtung aufweist und die zweite Testfläche eine
spezifisch mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper
bindefähige Beschichtung aufweist.
- 10
34. Festphase nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtungen homogen sind und jeweils nur einen einzigen
Typ eines bindefähigen Reagenz enthalten.
- 15
35. Festphase nach Anspruch 33 oder 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen auf einen nichtporösen Träger aufgebracht sind.
- 20
36. Festphase nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß der nichtporöse Träger aus Polystyrol gebildet ist.
- 25
37. Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß die einzelnen Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.
- 30

- 38 -

38. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 37 in einem Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers.
- 5 39. Testkit zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers umfassend eine Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 37 sowie markierte Nachweisreagenzien.
- 10 40. Testkit nach Anspruch 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein universelles Nachweisreagenz umfaßt.
- 15 41. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,
- 20 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des
25 Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen, wobei ein Signal oberhalb eines vorbestimmten testflächenspezifischen Grenzwerts als positiv und unterhalb eines vorbestimmten testflächenspezifischen Grenzwerts als negativ klassifiziert wird.

- 39 -

42. Verfahren nach Anspruch 41,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Grenzwerte jeweils individuell für eine Testfläche bestimmt
werden.

5

43. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Grenzwerte für mindestens 2 Testflächen unterschiedlich
festgelegt werden.

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/04310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/545

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	R. EKINS ET AL.: "Multianalyte microspot immunoassay. The microanalytical "compact disk" of the future." ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, vol. 50, no. 5, 1992, pages 337-353, XP000617908 PARIS, FR. abstract page 347 -page 353 --- -/--	1-43



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 1999

Date of mailing of the international search report

12/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/04310

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	R. EKINS ET AL.: "Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent--labelled antibodies." ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 227, no. 1, 1 December 1989 (1989-12-01), pages 73-96, XP002108690 AMSTERDAM, NL ISSN: 0003-2670 the whole document ----	1-43
Y	S. E. KAKABAKOS ET AL.: "Multianalyte immunoassay based on spatially distinct fluorescent areas quantified by laser-excited solid-phase time-resolved fluorometry " CLINICAL CHEMISTRY., vol. 38, no. 3, March 1992 (1992-03), pages 338-342, XP002108659 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 the whole document ----	1-43
Y	WO 97 32212 A (BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) 4 September 1997 (1997-09-04) claims ----	1-43
Y	US 5 627 026 A (T. P. O'CONNOR ET AL.) 6 May 1997 (1997-05-06) cited in the application abstract; claims 1-6 ----	1-43
Y	EP 0 461 462 A (ABBOTT LABORATORIES) 18 December 1991 (1991-12-18) cited in the application page 4, line 5 - line 28 ----	1-43
Y	WO 93 08472 A (MULTILYTE LIMITED) 29 April 1993 (1993-04-29) cited in the application claims 1-14,20-23 -----	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9732212 A	04-09-1997	EP 0904542 A	31-03-1999
US 5627026 A	06-05-1997	AT 130681 T	15-12-1995
		CA 1335880 A	13-06-1995
		DE 68924878 D	04-01-1996
		DE 68924878 T	18-04-1996
		EP 0351248 A	17-01-1990
		ES 2082777 T	01-04-1996
		GR 3018263 T	29-02-1996
		JP 2124461 A	11-05-1990
		JP 2717006 B	18-02-1998
EP 461462 A	18-12-1991	US 5120662 A	09-06-1992
		AU 7816591 A	10-10-1991
		AU 8174694 A	16-03-1995
		CA 2043689 A	05-12-1991
		JP 4232465 A	20-08-1992
WO 9308472 A	29-04-1993	AT 161964 T	15-01-1998
		AU 2872092 A	21-05-1993
		DE 69223980 D	12-02-1998
		DE 69223980 T	28-05-1998
		EP 0608370 A	03-08-1994
		ES 2112916 T	16-04-1998
		JP 7500906 T	26-01-1995
		US 5516635 A	14-05-1996
		ZA 9207977 A	26-07-1993

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 17316P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 04310	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/06/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/06/1998
Anmelder KARL, Johann		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/545

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	R. EKINS ET AL.: "Multianalyte microspot immunoassay. The microanalytical "compact disk" of the future." ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, Bd. 50, Nr. 5, 1992, Seiten 337-353, XP000617908 PARIS, FR. Zusammenfassung Seite 347 -Seite 353 --- -/--	1-43



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. November 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	R. EKINS ET AL.: "Development of microspot multi-analyte radiometric immunoassay using dual fluorescent--labelled antibodies." ANALYTICA CHIMICA ACTA, Bd. 227, Nr. 1, 1. Dezember 1989 (1989-12-01), Seiten 73-96, XP002108690 AMSTERDAM, NL ISSN: 0003-2670 das ganze Dokument ---	1-43
Y	S. E. KAKABAKOS ET AL.: "Multianalyte immunoassay based on spatially distinct fluorescent areas quantified by laser-excited solid-phase time-resolved fluorometry " CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 38, Nr. 3, März 1992 (1992-03), Seiten 338-342, XP002108659 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 das ganze Dokument ---	1-43
Y	WO 97 32212 A (BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) 4. September 1997 (1997-09-04) Ansprüche ---	1-43
Y	US 5 627 026 A (T. P. O'CONNOR ET AL.) 6. Mai 1997 (1997-05-06) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Ansprüche 1-6 ---	1-43
Y	EP 0 461 462 A (ABBOTT LABORATORIES) 18. Dezember 1991 (1991-12-18) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Zeile 5 - Zeile 28 ---	1-43
Y	WO 93 08472 A (MULTILYTE LIMITED) 29. April 1993 (1993-04-29) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-14, 20-23 -----	1-43

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04310

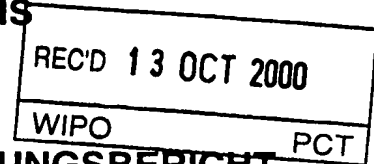
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9732212	A	04-09-1997	EP	0904542 A	31-03-1999
US 5627026	A	06-05-1997	AT	130681 T	15-12-1995
			CA	1335880 A	13-06-1995
			DE	68924878 D	04-01-1996
			DE	68924878 T	18-04-1996
			EP	0351248 A	17-01-1990
			ES	2082777 T	01-04-1996
			GR	3018263 T	29-02-1996
			JP	2124461 A	11-05-1990
			JP	2717006 B	18-02-1998
EP 461462	A	18-12-1991	US	5120662 A	09-06-1992
			AU	7816591 A	10-10-1991
			AU	8174694 A	16-03-1995
			CA	2043689 A	05-12-1991
			JP	4232465 A	20-08-1992
WO 9308472	A	29-04-1993	AT	161964 T	15-01-1998
			AU	2872092 A	21-05-1993
			DE	69223980 D	12-02-1998
			DE	69223980 T	28-05-1998
			EP	0608370 A	03-08-1994
			ES	2112916 T	16-04-1998
			JP	7500906 T	26-01-1995
			US	5516635 A	14-05-1996
			ZA	9207977 A	26-07-1993

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 17316P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04310	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/06/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/06/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/543		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/01/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.10.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Renggli, J Tel. Nr. +49 89 2399 7461 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04310

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-43 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	41-43
	Nein: Ansprüche	1-40
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	41-43
	Nein: Ansprüche	1-40
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-43
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Sektion V:

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1 Ekins R. et al., Ann. Biol. Clin., 1992, Vol. 50, S. 337-353
D2 Ekins R et al., Analytica Chimica Acta, 1989, Vol. 227, S. 73-96
D3 Kakabakos et al., Clin. Chem., 1992, Vol. 38/3, S. 338-342
D4 WO 97/32212
D5 US 5,627,026
D6 EP 0 461 462 A1
D7 WO 93/08472

2. Gewerbliche Anwendbarkeit (Art. 33(4) PCT):

Der Gegenstand der Ansprüche 1-43 ist gewerblich anwendbar.

3. Neuheit (Art. 33(2) PCT):

Da Ansprüche 1, 9 und 16 nicht klar sind (siehe Sektion VIII), sind die folgende Dokumente Neuheisschädlich für die folgende Ansprüche der vorliegenden Anmeldung:

In **D1** wird ein Verfahren zur gleichzeitigen Identifizierung mehrerer verschiedener Analyte beschrieben. Die Analyten werden durch die sehr empfindliche Microspot Technik identifiziert (Fläche und Herstellung der individuellen Testflächen, siehe Seiten 347, Spalte 1, letzter Absatz bis Seite 348; Seite 349, Spalte 1, Absatz 1; siehe auch D1, Seite 349, Spalte 2, letzter Absatz bis Seite 350, Spalte 1, erster Absatz; Seite 351, "Microspot immunoassay: experimental results" bis Seite 353). Das Verfahren von D1 ist im Zusammenhang mit allen Standard Immunoassay-Konzepten (Kompetitiv, nicht Kompetitiv mit markierten / nicht markierten Analyten, monoklonalen Antikörpern und/oder polyklonalen Antikörpern) anwendbar (siehe D1, Figs. 5-7 and 15; Seite 344, Seite 345, Spalte 2, dritter Absatz; Seite 346 bis Seite 347, Spalte 2, erster Absatz). Schliesslich offenbart D1 Methoden zur Bestimmung von assay-spezifischen Grenzwerten (siehe D1, Seite 339 "Immunoassay sensitivity: basic concepts and current myths, Spalten 1-2). D1

offenbart alle technische Merkmale der Ansprüche 1-14.

Da das Dokument **D2** ein ähnliches Verfahren wie **D1** beschreibt, offenbart **D2** auch alle technischen Merkmale der Ansprüche 1-14 (siehe **D2**, Seite 73, Zusammenfassung; Seite 74, letzter Satz; figs. 2 und 3; Seite 79-82; Seite 84-87 "Microspot immunoassay sensitivity: theoretical considerations"; Seite 91 "Solid antibody supports"; Seite 95).

Ansprüche 1-14 sind folglich im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu gegenüber **D1** und **D2**.

In **D3** wird ein Verfahren zum Nachweis von mehreren Analyten beschrieben (LH, FSH, hCG und PRL). Die Analyten wurden mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern, die auf Nitrozellulose Membranen gebunden sind, identifiziert. Die vier monoklonalen Antikörper wurden auf Mikrotiter Strips niedergesetzt (Testfläche) und dann wurden die Strips auf einen Plastikstab (nicht poröser Träger) geklebt. Danach wurden die Plastikstäbe mit vier verschiedenen biotinylierten Antikörpern inkubiert und schliesslich wurde die Streptavidinlösung, zum Nachweis des Vorhandenseins der Analyten, mit den Plastikstäben inkubiert. Als Alternative wird auch in **D3** auf die Mikrospottechnik hingewiesen (siehe **D3**, das ganze Dokument). Ansprüche 1-6, 7-10, 12-14 sind folglich im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu gegenüber **D3**.

D4 offenbart ein empfindliches optisches System zum Nachweis von mehreren verschiedenen Analyten (siehe Seite 23, Z. 33 bis Seite 24, Z. 15) mit Hilfe eines Standard Sandwich-Tests (siehe Seite 2, Z. 1-30; Seite 3, Z. 10-1; Seite 6, Z. 14-16; Seite 8, Z. 31 bis Seite 9; Seite 13, Z. 5 bis Seite 14, Z. 20). Die analyt-spezifischen Proben sind auf einem "Waveguide" immobilisiert und räumlich getrennt; Kontrollflächen werden auch offenbart (siehe Seite 16, Z. 17-26). Der "Waveguide" kann aus verschiedenen transparenten Materialien (z.B. Polystyrol) hergestellt werden und kann miniaturisiert werden (Seite 11, Z. 6-14; Seite 11, Z. 36-40; Seite 12, Z. 10-Seite 13, Z. 4; figs. 1-3). Ansprüche 1-3, 5-11 und 13-14 sind folglich im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu gegenüber **D4**.

D6 offenbart ein Verfahren zur gleichzeitigen Detektion verschiedener Analyte. Hochgereinigte Antigene von Krankheitserregern (HIV, siehe Seite 6, Z. 24-41) wurden auf einer Festphase immobilisiert (Seite 4, Z. 41 bis S. 5, Z. 2; S. 6, Z. 4

bis 7). Die Festphase enthält einen Plastikträger und, unter anderem, Polystyrol (siehe Seite 5, Z. 22 bis 50), die die verschiedene Antigene enthält. Der qualitative Nachweis der Antikörper wird unter Verwendung von einem Biotin-anti- Biotin Amplifizierungs System durchgeführt. Die Festphase enthält auch Kontrollflächen (S. 5, Z. 16-21). Ansprüche 1-3, 5-11 und 13-14 sind folglich im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu gegenüber D6. Desweiteren wird es auch darauf hingewiesen, dass die Testflächen der Ansprüche 1-3, 5-11 und 13-14 der vorliegenden Anmeldung auch porös sein können.

In **D7** wird ein Verfahren zum Nachweis von mehreren Analyten beschrieben. Die Analyte werden mit Hilfe von (i) Mikrospot-immobilisierten analyt-spezifischen Rezeptoren (e.g. DNS, mAk, pAk,...) und von (ii) freien analyt-spezifischen Rezeptoren (e.g. DNS, anti-DNS Ak, mAk, pAk,...) , die eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sind, nachgewiesen. Die signalgebende Gruppe von D7 sind markierte Latexpartikel (siehe D7, S. 4, Z. 27 bis S. 5, Z. 21; S. 6, Z. 3 bis 31; S. 9, Z. 11 bis 22; S. 9, Z. 23 bis S. 10, Z. 5). Die Testflächen von D7 haben einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm (S. 8, Z. 33) und können mit verschiedenen Analyten verwendet werden (siehe S. 14, Z. 25-31; Beispiele 5-12). Ansprüche 1-15 sind folglich im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu gegenüber D7.

D5 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von mehreren Analyten. Festphasen gebundene monoklonale Antikörper und/oder isolierte Antigene wurden verwendet, damit spezifische Antigene und/oder Antikörper nachgewiesen werden können. Das Verfahren wird unter Verwendung eines Sandwich-Tests mit markierten analyt-spezifischen Rezeptoren durchgeführt. D5 umfasst ein Verfahren durch das der Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers (e.g. HIV und anti-HIV Antikörper, p24) durchgeführt werden kann (siehe Spalte 2, Z. 26-58; Spalte 4, Z. 23-30; Spalte 5, Z. 1-9, Z. 31-65). Festphasen (z.B. Polystyrol, Spalte 6, Z. 56-60) und/oder Kits, die die Festphase enthalten, sind auch offenbart (Spalte 2, Z. 60-Spalte 3, Z. 3; Ansprüche 10-13); die Festphase enthält auch Kontrollflächen (Spalte 3, Z. 17-28; Spalte 7, Z. 65-Spalte 8, Z. 4). Ansprüche 1-14 und 16-40 sind folglich im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu gegenüber D5 zu sein. Die Antigene des Anspruchs 16, wie sie in der vorliegenden Anmeldung definiert worden sind (siehe

abhängige Ansprüche 24 und 25 der vorliegenden Anmeldung und auch Sektion VIII, unten), unterscheiden sich nicht von den Antigenen von D5 (siehe D5, Spalte 2, Z. 58-59, Spalte 3, Z. 4-7, Spalte 4, Z. 23-30). Es wird schliesslich darauf hingewiesen, dass D5 auch den räumlich getrennten Nachweis von Antigenen und spezifischen Antikörpern offenbart (siehe D5, Spalte 2, Z. 55, Ansprüche 1 und 9).

4. Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

Der Gegenstand des Anspruchs 41-43 unterscheidet sich von den zitierten Dokumenten der Stand der Technik dadurch, daß zwei räumlich getrennte Testflächen mit jeweils unterschiedlich immobilisierten analyt-spezifischen Rezeptoren auf der Festphase enthalten sind. Der Gegenstand der Ansprüche 41-43 ist somit neu gegenüber Dokumente D1-D7 (Artikel 33 (2) PCT).

Wie in der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung erwähnt, müssen zB. HIV- Tests zur Zeit separat bestätigt worden (siehe Beschreibung der vorliegenden Anmeldung, Seite 2, erster Absatz).

Die mit den vorliegenden Ansprüchen 41-43 zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein schnelleres Verfahren zur sichereren Detektion eines Analytes zu entwickeln.

Die in Anspruch 41 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung ist die Bereitstellung einer Festphase, die zwei unterschiedliche analytspezifische Rezeptoren enthält.

Diese Lösung ist nicht durch den Stand der Technik nahegelegt und Anspruch 41 kann deshalb als erfinderisch im Sinne von Artikeln 33(3) PCT angesehen werden. Es folgt dass der Gegenstand von Ansprüche 42-43 auch als erfinderisch angesehen wird (Art. 33(3) PCT).

Sektion VII:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der

Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D4 und D7 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Sektion VIII:

Bei den Ansprüchen 1, 9 und 16 dürfte es sich um Verfahrens bzw. um eine Festphase zur Nachweis **eines** Analyten handeln. Dennoch und im Zusammenhang mit den abhängigen Ansprüchen 2-3, 10 und 22 die alle technische Merkmalen ihres Hauptanspruchs besitzen (siehe Richtlinien, Sektion IV, III-3.4 und 3.5 PCT), kann der Analyt auch eine heterogene Population darstellen, wobei auch mehrere Analyten umfasst sein können.

Daher ist der Oberbegriff in Anspruch 1, der sich auf den Nachweis eines Analyte bezieht nicht klar (Art. 6 PCT).

Dieser Widerspruch zwischen den unabhängigen und abhängigen Ansprüchen führt zu Zweifeln bezüglich des Gegenstandes des Schutzbegehrens (Artikel 6 PCT).